

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12P 7/62</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/07879</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 26. Februar 1998 (26.02.98)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE97/01772 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 19. August 1997 (19.08.97)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 196 33 475.6      20. August 1996 (20.08.96)      DE  <b>(71) Anmelder:</b> BUNA SOW LEUNA OLEFINVERBUND GMBH [DE/DE]; D-06258 Schkopau (DE).  <b>(72) Erfinder:</b> METZNER, Klaus; Am Taubenbrunnen 17, D-06124 Halle (DE). SELA, Marion; Willi-Bredel-Strasse 21, D-06128 Halle (DE). RUNKEL, Dietmar; Feldschlößchenweg 48, D-06217 Merseburg (DE). SEMBRITZKI, Torsten; Beethovenstrasse 18, D-45128 Essen (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> JP, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
<b>(54) Title:</b> PROCESS TO OBTAIN POLYHYDROXY ALKANOATES AND THE USE THEREOF  <b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON POLYHYDROXYALKANOATEN UND DEREN VERWENDUNG  <b>(57) Abstract</b>  The process enables polyhydroxy alkanates to be obtained in an amorphous state from the cell structures of an alkanate accumulating microorganism. According to said process the cellular mass in aqueous phase is first subjected to mechanical forces, subsequently undergoes alkaline treatment at temperatures above 70 °C and lysis, and is then treated with hydrogen peroxide at temperatures of 70-95 °C, non-polymer cellular components being separated between the processing stages. The hydroxyalkanoate particles so obtained can be used as a polymer dispersion for surface coating, as a polymer-processing auxiliary agent or as supporting material in medicine.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Mit dem Verfahren werden aus den Zellstrukturen eines ein Polyhydroxyalkanoat akkumulierenden Mikroorganismus' Polyhydroxyalkanoate in ihrem amorphen Zustand dadurch gewonnen, daß die Zellmasse in der wäßrigen Phase zunächst mechanischen Kräften ausgesetzt ist, danach einer alkalischen Behandlung bei Temperaturen über 70 °C und einer Lyse unterzogen und anschließend bei 70 °C bis 95 °C mit Wasserstoffperoxid behandelt wird, wobei zwischen den Prozeßstufen nichtpolymere Zellbestandteile abgetrennt werden. Die so gewonnenen Polyhydroxyalkanoateilchen können als Polymerdispersion zur Oberflächenbeschichtung, als Polymerverarbeitungshilfsmittel oder als Trägermaterial im medizinischen Bereich verwendet werden.		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## **Verfahren zur Gewinnung von Polyhydroxyalkanoaten und deren Verwendung**

Das Verfahren findet Anwendung zur Gewinnung von Polyhydroxyalkanoaten (PHA) in Form von Polyhydroxybuttersäure, Polyhydroxyvaleriansäure oder Copolymeren dieser Polyhydroxyalkansäuren, welche in der Zellmasse von Mikroorganismen oder pflanzlicher Biomasse, die diese Polyhydroxyalkansäuren als innerzellulären Reservestoff akkumulieren, enthalten sind.

Zur Gewinnung von PHA aus der Zellmasse eines Mikroorganismus sind Lösungs- und Fällverfahren bekannt, bei denen die PHA in gelöster Form aus der Zellstruktur entfernt und von der Restbiomasse abgetrennt wird. So werden nach US 3044942 1,2-Dichlorethan im Gemisch mit Ethanol, nach EP 024810 Dichlormethan und nach US 3275610 Chloroform als Lösungsmittel für das PHA angewendet. Aus der von der Zellmasse abgetrennten PHA-haltigen Lösung wird durch geeignete Fällmittel das PHA in einer festen Form gewonnen. Nach DD 229428 erfolgt das Herauslösen von Polyhydroxybuttersäure aus der Biomasse mit Essigsäureanhydrid bei erhöhten Temperaturen, hier bei 100 bis 140 °C. Aus der Polymerlösung fällt die Polyhydroxybuttersäure durch Herabsetzen der Temperatur in pulverförmigem Zustand aus. Nachteilig wirkt sich dabei der Umgang mit großen Lösungsmittelmengen und der damit verbundene Recycling- bzw. Entsorgungsaufwand aus. Dies trifft insbesondere auf chlorierte Kohlenwasserstoffe als Lösungsmittel zu. Darüber hinaus sind diese Verfahren häufig mit starkem Molekulargewichtsabbau und Bildung eines kristallinen PHA-Anteils verbunden.

In der Patentanmeldung WO 95/08620 ist ein Gewinnungsverfahren für ein in einer Zellmasse enthaltenes festes Produkt dargestellt, bei welchem die Zellmasse in eine gelöste Form überführt und zusammen mit der wäßrigen Fermentationsbrühe so abgetrennt wird, daß das unlösliche Produkt, beispielsweise in der Zellmasse enthaltenes Indigo, in fester Form vorliegt. Das Lösen der Zellsubstanzen erfolgt durch Zugabe von Alkalilauge bei einer Behandlungstemperatur zwischen 40 und 100 °C. Das Gewinnungsverfahren für Zellinhaltsstoffe kann aber auch durch Lysieren der Zellsubstanzen mittels einer enzymatischen Behandlung erfolgen, insbesondere

durch Einsatz von Lysozym, Proteasen, DNAsen, RNAsen oder einer Kombination dieser.

Zur Gewinnung eines Plaststoffes aus einer, einen solchen Stoff akkumulierenden, Mikroorganismenzelle, wird in der Patentanmeldung WO 94/24302 ein Verfahren dargestellt, welches mit Hilfe eines oxidierenden Mediums in Gegenwart eines Komplexbildners die Zellhüllen der Mikroorganismen auflöst. Beispielsweise wird zur Gewinnung von Polyhydroxybuttersäure ein Wasserstoffperoxid bei einer Behandlungstemperatur zwischen 60 und 180 °C als oxidierendes Mittel eingesetzt. Als Vorstufe zur oxidativen Behandlung ist eine physikalische Vorbereitung des Zellmaterials möglich, insbesondere durch eine Temperaturbehandlung im Bereich zwischen 100 und 200 °C.

Ein weiterer Effekt von Peroxiden, beispielsweise Wasserstoffperoxid, kommt in der Patentanmeldung WO 94/10289 für einen Prozeß zur Gewinnung von Produkten aus einer wäßrigen Zusammensetzung zur Zersetzung von Nucleinsäuren zur Anwendung, wenn die Menge an Nucleinsäure ausreicht, die Viskosität derartig zu erhöhen, daß nachfolgende Prozeßschritte beeinträchtigt werden. Die Konzentration der in Wasser gelösten Nucleinsäuren wird mit > 0,1 g/l angegeben, beispielsweise 0,5-20 g/l.

Hinsichtlich der genannten Aufgabenstellung ergeben sich bei diesen bekannten Verfahren unterschiedliche Nachteile. Problematisch bei den Extraktionsverfahren ist der Umgang mit großen Lösungsmittelmengen. Übliche Einsatzmengen liegen, bezogen auf die Biomasse, im Bereich von 8 : 1 bis 20 : 1. Diese Lösungsmittel müssen ordnungsgemäß entsorgt oder aufwendig aufgearbeitet werden, was erhebliche Kosten und zusätzlichen apparativen Aufwand verursacht. Lösungsmittelrückstände im Produkt, insbesondere bei Verwendung schlecht umweltverträglicher Substanzen, müssen in zusätzlichen Reinigungsschritten abgetrennt werden. Speziell bei Anwendungen im Lebensmittelbereich und bei medizinischen Applikationen sind die Anforderungen an die Produktreinheit sehr hoch.

Ein weiterer Nachteil extraktiver Verfahren ist die Bildung eines kristallinen Anteils in der Polyhydroxyalkanoatstruktur. Die in vollständig amorpher Form im Mikroorganismus vorliegenden Polymere erfahren dabei eine Veränderung einiger physikalischer Eigenschaften. Diese können negativen Einfluß auf die Filmbildung und die Vernetzbarkeit der Moleküle beispielsweise bei Dispersionsanwendungen haben. Die übrigen Verfahren wirken sehr spezifisch, d.h. sie bewirken eine Denaturierung, Lyse oder Abtrennung einiger weniger Zellkomponenten und sind in der Regel für die Herstellung eines reinen Produktes in einem Behandlungsschritt nicht ausreichend geeignet, so daß die sinnvolle Kombination verschiedener Aufarbeitungsschritte nötig ist.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Polyhydroxyalkanoat, insbesondere Polyhydroxybuttersäure, Polyhydroxyvaleriansäure oder ein Copolymerisat dieser mit einer Partikelgröße unter 1,5 µm aus einer wäßrigen Zellsuspension eines diese Polymere akkumulierenden Mikroorganismus zu gewinnen und diese zu verwenden. Dabei ist es erforderlich, daß die in den Zellen der Mikroorganismen in amorphem Zustand eingelagerten Granulen des Polymers in diesem Zustand möglichst unverändert erhalten bleiben und ein Anteil an kristalliner Struktur des Polymers ausgeschlossen bzw. vernachlässigbar gering gehalten wird.

Die Aufgabe wird durch die in den Patentansprüchen dargestellte Erfindung gelöst. Das vorliegende Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß, ohne Verwendung von PHA-Lösern, durch Kombination mechanischer, chemischer und enzymatischer Behandlungen der bakteriellen Biomassesuspension mit dazwischengeschalteter Abtrennung der herausgelösten Zellbestandteile eine Dispersion mit hohem Anteil an Polyhydroxyalkanoaten entsteht. Der erzielte PHA-Anteil richtet sich dabei nach dem PHA-Gehalt der Biomasse sowie der Anzahl der eingesetzten Aufarbeitungsschritte. In dem mehrstufigen Prozeß erfolgt zunächst die Zerstörung der Zellwände durch die Einwirkung von mechanischen Kräften auf die sich in der wäßrigen Phase befindlichen Mikroorganismenzellen. Solche mechanischen Kräfte können durch die Erzeugung von Stoß-, Reibungs-, Scher- oder Druckkräften in bekannten Vorrich-

tungen hervorgerufen werden. Dabei ist es auch möglich, solche Kräfte in ihrer reinen Form, wie auch in überlagerter oder alternierender Form auf das Zellmaterial einwirken zu lassen.

Die bakterielle Biomasse wird im ersten Schritt einem mechanischen Zellaufschluß, beispielsweise in einer Rührwerkskugelmühle oder einem Hochdruckhomogenisator unterzogen. Der Aufschluß dient zur Zerstörung der festen Zellhülle und Freisetzung wasserlöslicher bzw. mit Wasser ausspülbarer Zellkomponenten. Weiterhin wird eine vergrößerte Oberfläche für den Angriff biologischer oder chemischer Substanzen geschaffen. Die Abtrennung zwischen den Behandlungsschritten erfolgt durch Separation, Zentrifugation oder über Dekanter. Dabei werden gelöste Substanzen, feine Zellbruchstücke und Verunreinigungen im Klarlauf abgetrennt, was jeweils zu einer Aufkonzentrierung der Polyhydroxyalkanoat-Granulen führt.

Im folgenden Schritt schließt sich eine alkalische Behandlung, beispielsweise durch Natronlauge, in einem pH-Bereich von 8-12 an. Diese Behandlung ist begleitet durch ein Aufheizen der Suspension auf eine Temperatur über 70 °C und führt zur Hydrolyse bestimmter Zellkomponenten.

Nach Neutralisation kann eine enzymatische Reinigung vorzugsweise proteolytischen Charakters zur Lyse freigesetzter Zellbestandteile zum Einsatz kommen. Im Gegensatz zu enzymatischen Aufschlußverfahren wird hierbei ein geringerer Restgehalt an Biomaterie und damit ein reineres Produkt, hohe Lagerstabilität wie auch die Möglichkeit der Herstellung leicht resuspendierbarer Dispersionspulver, die die stabilste Lagerform darstellen, erreicht. Bewährt haben sich beispielsweise Gemische zellwandlysierender Enzyme in Kombination mit reinen Proteasen.

Nach Abtrennung der lysierten Zellbestandteile erfolgt eine Wasserstoffperoxidbleiche bei einer Temperatur zwischen 70 °C bis 95 °C mit abschließender Wäsche. Dabei kommen Mischungsverhältnisse von einem Teil Polyhydroxyalkanoatgranulen mit Zellrestbestandteilen zu 5 bis 100 Teilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Konzentrationen von 1 bis 33 % zum Einsatz. Durch diese Behandlung erfolgt die Denaturierung von Restproteinen, das Erreichen eines optisch reinweißen Produktes sowie eine Konservierung, die die Lagerstabilität und die Anfälligkeit gegenüber Fäulnis verbessert.

Je nach Mikroorganismus und gewünschter Produktreinheit können Behandlungsstufen entfallen, dies gilt hauptsächlich für die aufwendige und teure Enzymbehandlung, die nur in Ausnahmefällen nötig ist. Für die Aufarbeitung von Polyhydroxybuttersäure hat sich die vorliegende Reihenfolge der Behandlungsschritte als optimale Behandlungsweise erwiesen. Vorwäschen mit Laugen im Sinne eines alkalischen Aufschlusses bzw. mechanische Zellerstörung in alkalischem Medium führten zu keiner Verbesserung des Aufarbeitungsergebnisses. Werden die Aufarbeitungsschritte in anderer Reihenfolge verwendet, kann es in Abhängigkeit vom eingesetzten Mikroorganismus zu erheblichen Verschlechterungen des Ergebnisses kommen. Eine Reduzierung der Trennschritte zwischen den Behandlungen ist zur Gewinnung eines sehr reinen Produktes selten sinnvoll.

Solche nach dem erfindungsgemäßen Verfahren aus Zellen von Mikroorganismen gewonnene Polymerpartikel eignen sich besonders zur Herstellung von Polymerdispersionen. Dies kann direkt oder durch Resuspendierung der nach dem beschriebenen Gewinnungsverfahren in getrockneter Form vorliegenden PHA-Partikel in einem flüssigen Medium, vorzugsweise in Wasser, erfolgen. Dabei ist ein Einsatz von Dispergierhilfsmitteln, Filmbildnern, Antischaummitteln usw. möglich. Der Anteil von fester Phase zur flüssigen Phase ist abhängig vom vorgesehenen Anwendungsfall der entsprechenden Dispersion.

Diese Dispersionen eignen sich zur Herstellung von Überzügen oder Beschichtungen von Oberflächen. Insbesondere können dies Oberflächen eines Zellulosematerials, wie Pappe oder Papier sein, da damit neben den Sperreigenschaften eine vollständige biologische Abbaubarkeit dieser beschichteten Materialien gewährleistet wird. Außer durch Aufbringen auf Oberflächen kann dieser Effekt ebenfalls durch Einbringen der Dispersion in die Papierpulpe erfolgen.

Gleichfalls kann eine nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Dispersion als Hilfsmittel für die Verarbeitung von Polymeren, insbesondere bei der Verarbeitung von PVC, eingesetzt werden. Dabei wirkt sich der Gehalt an Stickstoff im Polyhydroxyalkanoat stabilisierend auf das zu bearbeitende Polymer aus.

Speziell wegen der ausgesprochen guten Human- oder Veterinärverträglichkeit der Polyhydroxyalkansäuren eignen sich daraus hergestellte Dispersionen als Trägermaterial zur Einbringung von medizinischen Kontrastmitteln und Wirkstoffen.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird an folgenden Beispielen näher erläutert:

Durch einen Fermentationsprozeß im batch-Verfahren werden Mikroorganismen durch eine entsprechende Wachstumsphase mit anschließend initiierteter Akkumulation zur Einlagerung von Polyhydroxybuttersäure in der Zelle kultiviert. Die erzielbare Polymerkonzentration hängt sehr stark von der Art des Mikroorganismus und den Fermentationsbedingungen ab. Für technisch relevante Prozesse wird von einem Polymeranteil größer 50 % der Zelltrockenmasse ausgegangen.

### 1. Beispiel

Durch Kultivierung des Mikroorganismus *Methylobacterium rhodesianum* wurde nach Beendigung des Fermentationsprozesses ein PHB-Gehalt von 52 % erzielt. Die Ausgangsbiomassekonzentration bezogen auf die Trockensubstanz betrug 50 g/l.

1. Schritt : Zellaufschluß in einem Hochdruckhomogenisator (850 bar, 2 Passagen) und Abtrennung von Zellbruchstücken über Tellerseparator (5000 g)
2. Schritt : Natronlaugebehandlung 2h bei 85 °C und pH 11
3. Schritt : Wasserstoffperoxidbleiche mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (33 %) im Verhältnis 1 : 10, 2 h bei 85 °C
4. Schritt : Waschen und Eindicken über Tellerseparator

<b>Dispersion: mittl. Partikeldurchmesser</b>	<b>: 1,34 µm</b>
<b>Feststoffanteil</b>	<b>: 38 g/l</b>
<b>PHB-Gehalt des Feststoffes</b>	<b>: 78 %</b>
<b>Stickstoffgehalt</b>	<b>: 0,7 %</b>



Der angestrebte Zielkornbereich wird deutlich erreicht. Die Angabe des Stickstoffgehaltes im Produkt spiegelt den Restbiomassegehalt wieder und dient als Maß für die Produktreinheit.

## 2. Beispiel

gemäß Beispiel 1, aber:

1. Schritt : mechanischer Zellaufschluß in einer Rührwerkskugelmühle (2 Passagen) und Abtrennung von Zellbruchstücken über Tellerseparator (5000 g)
2. Schritt : Natronlaugebehandlung 3 h bei 85 °C und pH 9, Waschen über Tellerseparator
3. Schritt : Wasserstoffperoxidbleiche mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (33 %) im Verhältnis 1 : 10, 4 h bei 75 °C
4. Schritt : Waschen und Eindicken über Tellerseparator

<b>Dispersion: mittl. Partikeldurchmesser</b>	<b>: 1,22 µm</b>
<b>Feststoffanteil</b>	<b>: 39 g/l</b>
<b>PHB-Gehalt des Feststoffes</b>	<b>: 82 %</b>
<b>Stickstoffgehalt</b>	<b>: 0,4 %</b>

## 3. Beispiel

gemäß Beispiel 1, aber

1. Schritt : mechanischer Zellaufschluß in einer Rührwerkskugelmühle (2 Passagen) und Abtrennung von Zellbruchstücken über Tellerseparator (5000 g)
2. Schritt : Natronlaugebehandlung 4 h bei 85 °C und pH 8, Waschen über Tellerseparator
3. Schritt : Enzymbehandlung durch *Streptomyces*-Spezies in Verbindung mit Proteasen
4. Schritt : 3fach Waschen und Eindicken über Tellerseparator

<b>Dispersion: mittl. Partikeldurchmesser</b>	<b>: 1,12 µm</b>
<b>Feststoffanteil</b>	<b>: 38 g/l</b>

<b>PHB-Gehalt des Feststoffes</b>	<b>: 92 %</b>
<b>Stickstoffgehalt</b>	<b>: 0,3 %</b>

#### 4. Beispiel

Im 4. Beispiel wurde die Möglichkeit der Herstellung eines Dispersionspulvers mit anschließender Resuspendierung untersucht. Dazu wurde die in Beispiel 2 hergestellte Roh-Dispersion verwendet.

gemäß Beispiel 2, aber:

5. Schritt : Sprühtrocknung der Dispersion zur Erzeugung eines Dispersionspulvers  
(erreichter mittl. Partikeldurchmesser 5,2 µm )
6. Schritt : Resuspendierung in Wasser mittel Ultraturrax

<b>Dispersion: mittl. Partikeldurchmesser</b>	<b>: 1,43 µm</b>
<b>Feststoffanteil</b>	<b>: 35 g/l</b>
<b>PHB-Gehalt des Feststoffes</b>	<b>: 82 %</b>
<b>Stickstoffgehalt</b>	<b>: 0,7%</b>

#### 5. Beispiel

Im letzten Beispiel wurde der Versuch auf Grundlage einer Biomasse mit erheblich höherem Ausgangs-PHB-Gehalt durchgeführt. Durch Kultivierung des Mikroorganismus *Alcaligenes eutrophus* wurde nach Beendigung des Fermentationsprozesses ein PHB-Gehalt von 76 % erzielt. Die Ausgangsbiomassekonzentration bezogen auf die Trockensubstanz betrug 52 g/l. Im Gegensatz zu den vorherigen Beispielen wurde hier bereits die Fermenterbrühe über Tellerseparator aufkonzentriert und auf einen Biotrockenmassegehalt von 137 g/l gebracht.

1. Schritt : Zellaufschluß in einem Hochdruckhomogenisator (1000 bar, 1 Passage)  
und Abtrennung von Zellbruchstücken über Tellerseparator (5000 g)
2. Schritt : Natronlaugebehandlung 2 h bei 75 °C und pH 10, Waschen über  
Tellerseparator
3. Schritt : Wasserstoffperoxidbleiche mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (33 %) im Verhältnis 1 : 10, 2 h bei

80 °C

4. Schritt : Waschen und Eindicken

<b>Dispersion:</b>	<b>mittl. Partikeldurchmesser</b>	<b>: 0,95 µm</b>
	<b>Feststoffanteil</b>	<b>: 42 g/l</b>
	<b>PHB-Gehalt des Feststoffes</b>	<b>: 95 %</b>
	<b>Stickstoffgehalt</b>	<b>: 0,02 %</b>

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung von Polyhydroxyalkanoaten, die als Granulen im Verlauf eines Fermentationsverfahrens in den Zellen eines Mikroorganismus akkumuliert werden, aus einer in einer wäßrigen Phase enthaltenen Zellmasse durch ein- oder mehrmaligen Aufschluß der Zellen und Abtrennung von Zellbestandteilen dadurch gekennzeichnet, daß
  - a) in der wäßrigen Phase die Zellwände der Mikroorganismen zunächst Reibungs-, Stoß-, Scher- und/oder Druckkräften ausgesetzt werden,
  - b) die in der Suspension verbleibenden Teile der Zellmasse und Polyhydroxyalkanoatgranulen einer alkalischen Behandlung mit einem pH-Wert von 8-12 bei einer Temperatur über 70 °C in einer Zeitdauer von 1 bis 4 h unterzogen und anschließend die wäßrige Phase neutralisiert wird,
  - c) die verbliebene Zellmasse einer Lyse der zerkleinerten und freigesetzten Zellbestandteile unterzogen wird,
  - d) die Polyhydroxyalkanoatgranulen mit Restbestandteilen der Zellmasse in Suspension in einem Verhältnis von 1:100 bis 1:5 mit Wasserstoffperoxid der Konzentration 1% bis 33% bei einer Temperatur von 70 °C bis 95 °C , behandelt werden und
  - e) die Polyhydroxyalkanoatdispersion gewaschen und
  - f) gegebenenfalls in an sich bekannter Weise getrocknet werden,wobei zwischen den Prozeßstufen ein Teil oder die gesamten erzielten Zellbruchstücke und die in flüssige Phase überführten, löslichen Substanzen der Zellmasse aus der Fermenterbrühe separiert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Polyhydroxyalkanoat eine Polyhydroxybuttersäure, eine Polyhydroxyvaleriansäure oder ein Copolymeres dieser ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die mechanischen Zellerstörung in einer Rührwerkskugelmühle oder einem Hochdruckhomogenisator erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die alkalische Behandlung der in der wäßrigen Phase enthaltenen Zellmasse mit Natronlauge bei einer Temperatur größer 70 °C erfolgt.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Lyse der zerkleinerten und freigesetzten Zellbestandteile durch Behandlung mit Enzymen von *Streptomyces*-Spezies erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die getrockneten Polyhydroxyalkanoatpartikel gegebenenfalls unter Hinzufügen von Dispergierhilfsmitteln redispersiert werden.
7. Verwendung einer nach Anspruch 1 bis 6 hergestellten Dispersion aus Polyhydroxyalkanoaten zur Herstellung von Überzügen oder Beschichtungen von Oberflächen.
8. Verwendung einer nach Anspruch 1 bis 6 hergestellten Dispersion aus Polyhydroxyalkanoaten als biologisch abbaubarer Füllstoff.
9. Verwendung einer nach Anspruch 1 bis 6 hergestellten Dispersion aus Polyhydroxyalkanoaten zum Einsatz als Verarbeitungshilfsmittel für Polymere.
10. Verwendung einer nach Anspruch 1 bis 6 hergestellten Dispersion aus Polyhydroxyalkanoaten als Trägermaterial zur Einbringung von Kontrastmitteln oder pharmazeutischen Wirkstoffen im medizinischen Bereich.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 97/01772

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C12P7/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 92 22659 A (KANEBO LTD) 23 December 1992 see claims ---	1
A	WO 95 33065 A (PROCTER & GAMBLE) 7 December 1995 see claims ---	1
A	WO 95 33064 A (PROCTER & GAMBLE) 7 December 1995 see claims ---	1
A	EP 0 145 233 A (ICI PLC) 19 June 1985 see claims ---	1
A	EP 0 622 462 A (REPSOL QUIMICA SA) 2 November 1994 see claims ---	1
-/--		



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 January 1998

Date of mailing of the international search report

16/01/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 551 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Delanghe, L

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. .onal Application No

PCT/DE 97/01772

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 1, 3 July 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 8042, YAMAMOTO, OSAMU ET AL: "Separation and purification of poly(hydroxyalkanoates) from microorganisms using surfactants" XP002051163 see abstract & JP 07 079 787 A (DENKI KAGAKU KOGYO KK, JAPAN) -----	1
A	WO 94 24302 A (ZENECA LTD ;LIDDELL JOHN MACDONALD (GB); LOCKE TIMOTHY JOHN (GB)) 27 October 1994 cited in the application see claims -----	1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. onal Application No

PCT/DE 97/01772

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9222659 A	23-12-92	JP 5049487 A	02-03-93
WO 9533065 A	07-12-95	AU 2650095 A	21-12-95
		CA 2191713 A	07-12-95
		EP 0763126 A	19-03-97
		FI 964785 A	29-01-97
WO 9533064 A	07-12-95	AU 2649795 A	21-12-95
		BR 9507814 A	12-08-97
		CA 2191570 A	07-12-95
		EP 0763125 A	19-03-97
		FI 964786 A	29-01-97
EP 0145233 A	19-06-85	CA 1320164 A	13-07-93
		DE 3472271 A	28-07-88
		JP 1776982 C	28-07-93
		JP 4061638 B	01-10-92
		JP 60145097 A	31-07-85
		US 4910145 A	20-03-90
EP 0622462 A	02-11-94	ES 2062955 A	16-12-94
		US 5536419 A	16-07-96
WO 9424302 A	27-10-94	AT 160819 T	15-12-97
		AU 676035 B	27-02-97
		AU 6434494 A	08-11-94
		BR 9406452 A	02-01-96
		CA 2160564 A	27-10-94
		EP 0694074 A	31-01-96
		FI 954836 A	11-10-95
		JP 8508881 T	24-09-96
		NO 954088 A	13-10-95
		US 5691174 A	25-11-97
		ZA 9402515 A	13-01-95



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inta.ionales Aktenzeichen

PCT/DE 97/01772

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12P7/62

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 92 22659 A (KANEBO LTD) 23.Dezember 1992 siehe Ansprüche	1
A	WO 95 33065 A (PROCTER & GAMBLE) 7.Dezember 1995 siehe Ansprüche	1
A	WO 95 33064 A (PROCTER & GAMBLE) 7.Dezember 1995 siehe Ansprüche	1
A	EP 0 145 233 A (ICI PLC) 19.Juni 1985 siehe Ansprüche	1
A	EP 0 622 462 A (REPSOL QUIMICA SA) 2.November 1994 siehe Ansprüche	1
-/-		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. Januar 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

16/01/1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Delanghe, L

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 1, 3.Juli 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 8042, YAMAMOTO, OSAMU ET AL: "Separation and purification of poly(hydroxyalkanoates) from microorganisms using surfactants" XP002051163 siehe Zusammenfassung & JP 07 079 787 A (DENKI KAGAKU KOGYO KK, JAPAN) ---	1
A	WO 94 24302 A (ZENECA LTD ;LIDDELL JOHN MACDONALD (GB); LOCKE TIMOTHY JOHN (GB)) 27.Oktober 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche -----	1

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/01772

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9222659 A	23-12-92	JP 5049487 A	02-03-93
WO 9533065 A	07-12-95	AU 2650095 A	21-12-95
		CA 2191713 A	07-12-95
		EP 0763126 A	19-03-97
		FI 964785 A	29-01-97
WO 9533064 A	07-12-95	AU 2649795 A	21-12-95
		BR 9507814 A	12-08-97
		CA 2191570 A	07-12-95
		EP 0763125 A	19-03-97
		FI 964786 A	29-01-97
EP 0145233 A	19-06-85	CA 1320164 A	13-07-93
		DE 3472271 A	28-07-88
		JP 1776982 C	28-07-93
		JP 4061638 B	01-10-92
		JP 60145097 A	31-07-85
		US 4910145 A	20-03-90
EP 0622462 A	02-11-94	ES 2062955 A	16-12-94
		US 5536419 A	16-07-96
WO 9424302 A	27-10-94	AT 160819 T	15-12-97
		AU 676035 B	27-02-97
		AU 6434494 A	08-11-94
		BR 9406452 A	02-01-96
		CA 2160564 A	27-10-94
		EP 0694074 A	31-01-96
		FI 954836 A	11-10-95
		JP 8508881 T	24-09-96
		NO 954088 A	13-10-95
		US 5691174 A	25-11-97
		ZA 9402515 A	13-01-95